

DONGWU BINGYUAN WEISHENGWU JIANCE JISHU

舒黛廉 著

动物病原微生物 检测技术



黄河水利出版社

动物病原微生物检测技术

舒黛廉 著

黄河水利出版社

· 郑州 ·

内 容 提 要

本书系统介绍了动物病原微生物检测技术,全书共分4篇13章。第一篇实验室建设,主要介绍畜禽疫病实验室设计、规章制度,仪器、器材的使用及维护。第二篇动物疫病实验室检验基础知识,主要介绍细菌学、病毒学、真菌学、血清学、分子生物学检验基本技术,检验病料的采集、处理、保存及送检、显微检验技术。第三篇兽医实验室检测技术,着重叙述细菌对药物的敏感试验、抗体检测技术。第四篇畜禽疫病实验室检测技术,重点介绍家禽、猪、牛、羊、犬、兔的细菌性、病毒性、真菌性疫病的实验室检测技术,为畜禽疫病的诊断提供帮助。本书在编写的过程中,注重内容的系统性、科学性和先进性,并配置了大量的图片,力求实用和直观。

本书既可作为广大基层临床兽医及兽医化验室的工作人员、畜禽养殖场技术人员、检疫员的参考书,又可作为大专院校、科研单位畜禽疫病防治工作人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

动物病原微生物检测技术/舒黛廉著. —郑州:黄河水利出版社,2014.7

ISBN 978 - 7 - 5509 - 0832 - 1

I. ①动… II. ①舒… III. ①动物疾病 - 病原微生物 - 微生物检定 IV. ①S852.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 152799 号

组稿编辑:王路平 电话:0371-66022212 E-mail:hhslwlp@126.com

出版社:黄河水利出版社

地址:河南省郑州市顺河路黄委会综合楼14层 邮政编码:450003

发行单位:黄河水利出版社

发行部电话:0371-66026940,66020550,66028024,66022620(传真)

E-mail:hhslcbs@126.com

承印单位:河南新华印刷集团有限公司

开本:787 mm × 1 092 mm 1/16

印张:22

字数:510千字

印数:1—1 000

版次:2014年7月第1版

印次:2014年7月第1次印刷

定价:60.00元

前 言

近年来,畜禽疫病非典型性、混合感染病例日益增多,给临床诊断带来了较多的困难,随着科学技术的发展,畜禽疫病检测实验室建设及病原微生物的检测技术都取得了很大的发展,为畜禽疫病的诊断、检测提供了科学结果及依据。

本书系统介绍了动物病原微生物的检测技术,并配置了大量的图谱,力求实用和直观。全书共分4篇13章。第一篇实验室建设,主要介绍畜禽疫病实验室设计与规程、规章制度,仪器、器材的选购、使用及维护。第二篇动物疫病实验室检验基础知识,主要介绍细菌学、病毒学、真菌学、血清学、分子生物学检验基本技术,检验病料的采集、处理、保存及送检、显微检验技术。第三篇兽医实验室检测技术,着重叙述细菌对药物的敏感试验、抗体检测技术。第四篇畜禽疫病实验室检测技术,重点介绍家禽、猪、牛、羊、犬、兔的细菌性、病毒性、真菌性疫病的实验室检测时的病料采集及处理、病原分离鉴定、实验检验方法、血清学检测方法,为畜禽疫病的诊断提供科学的诊断依据。

本书既可作为广大基层临床兽医及兽医化验室的工作人员、畜禽养殖场技术人员、检疫员的参考书,又可作为大专院校、科研单位畜禽疫病防治工作人员的参考书。

由于作者水平有限,书中难免会有遗漏和错误,欢迎各位专家、同仁和广大读者给予批评、指正。

作 者

2014年4月

目 录

前 言

第一篇 实验室建设

第一章 实验室设计与规程	(1)
第一节 实验室设计布局	(1)
第二节 无菌室	(2)
第三节 实验室的管理规程	(3)
第四节 实验室生物安全知识	(6)
第二章 仪器及器材	(8)
第一节 仪 器	(8)
第二节 器 材	(30)
第三节 玻璃仪器	(31)

第二篇 动物疫病实验室检验基础知识

第三章 细菌学检验基本技术	(36)
第一节 细菌的形态与结构	(36)
第二节 形态学检查技术	(40)
第三节 细菌的分离培养技术	(49)
第四节 生物化学特性检查法	(71)
第五节 细菌的抗原特性检查	(79)
第六节 动物实验检查法	(81)
第四章 病毒学检验基本技术	(87)
第一节 病毒的形态结构和化学组成	(87)
第二节 动物感染实验检查法	(90)
第三节 禽胚培养检查法	(93)
第四节 组织细胞培养检查法	(98)
第五节 病毒的分离鉴定技术	(103)
第六节 病毒提纯技术	(113)
第五章 真菌学检验基本技术	(119)
第一节 形态学检查	(119)
第二节 真菌培养	(119)
第三节 真菌毒素检测技术	(121)

第六章 血清学检验技术	(124)
第一节 凝集反应试验	(124)
第二节 沉淀反应试验	(128)
第三节 补体结合试验	(131)
第四节 中和试验	(134)
第五节 免疫标记技术	(137)
第七章 分子生物学及分析生物学检验技术	(148)
第一节 病原微生物 DNA 中 G + C mol% 含量的测定	(148)
第二节 PCR 技术	(150)
第三节 核酸探针技术	(157)
第八章 病料标本的采集、处理、保存和送检	(169)
第一节 血液标本	(169)
第二节 实质脏器标本	(170)
第三节 呼吸系统标本	(171)
第四节 粪便标本	(172)
第五节 其他	(172)

第三篇 兽医实验室检测技术

第九章 细菌对药物敏感试验	(175)
第一节 概述	(175)
第二节 体外抗菌药物敏感试验	(175)
第三节 抗菌素的联合药敏试验	(178)
第十章 抗体检测技术	(182)
第一节 猪瘟抗体检测	(182)
第二节 猪伪狂犬病抗体检测	(184)
第三节 猪口蹄疫抗体检测	(188)
第四节 猪传染性萎缩性鼻炎抗体检测	(193)
第五节 猪乙型脑炎抗体检测	(194)
第六节 猪传染性胸膜炎抗体检测	(196)
第七节 猪喘气病抗体检测	(197)
第八节 新城疫抗体检测	(199)
第九节 鸡法氏囊病抗体检测	(201)
第十节 禽流感抗体检测	(202)
第十一节 鸡支原体抗体检测	(206)

第四篇 畜禽疫病实验室检测技术

第十一章 禽病实验室检测技术	(208)
第一节 病毒性疾病	(208)

第二节 细菌性疾病	(244)
第三节 真菌性疾病	(257)
第十二章 猪病实验室检测技术	(261)
第一节 病毒性传染病	(261)
第二节 细菌性疾病	(285)
第三节 霉菌毒素中毒	(318)
第十三章 其他动物疫病实验室诊断技术	(321)
第一节 牛疫病实验室诊断技术	(321)
第二节 羊、兔、犬疫病实验室诊断技术	(333)
参考文献	(341)

第一篇 实验室建设

第一章 实验室设计与规程

第一节 实验室设计布局

畜禽疫病诊断实验室是专门从事与动物及其产品有关的动物传染病、中毒病等的血清学、病原学、生物化学、免疫学和分子生物学诊断的专业场所。实验室有贵重的精密仪器和各种化学药品、试剂以及各种各样的病原微生物。这些病原微生物不仅可使畜禽致病,同时还可感染人,如果控制不严可引起扩散,不仅污染实验室,导致检验结果的失败或误差,还可能污染周围环境,引起畜禽疫病的流行与暴发。易燃及腐蚀性的化学试剂,以及在操作中产生的有害气体或蒸气,对实验操作者及仪器设备会产生一定损害。因此,对畜禽疫病诊断实验室的房室结构、环境、布局、室内设施等有特殊要求,在筹建新的或改建原有的实验室时都应考虑这些因素。

畜禽疫病诊断实验室可分为精密仪器室、实验操作室、无菌室、畜禽病理解剖室、辅助室(样品室、洗涤消毒室、办公室、动物房)等。更专业的诊断室根据其工作领域不同,可详分为病理学诊断室、血清学诊断室、病原学诊断室、毒理学实验室、分子生物学诊断室等。

一、实验室地理位置

要求远离灰尘、烟雾、噪声和震动源环境。因此,实验室不应建在交通要道、锅炉房、机房的附近。为了保持良好的通风及采光条件,一般应为南北方向。

二、精密仪器室设计要求

精密仪器室要求具有防火、防震、防潮、防尘、防腐蚀、防有害气体侵入的功能,室温尽可能保持恒定。为保持一般仪器良好的使用性能,温度应控制在 $15 \sim 30^{\circ}\text{C}$,有条件的最好控制在 $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$,湿度在70%以下。需要恒温的仪器室,可装双层门窗及空调装置。仪器室可用水磨石或防静电地板。

大型精密仪器的仪器室应设计有专用地线,接地板电阻小于 $4\ \Omega$ 。放仪器用的实验台与墙距离50 cm,以便于操作与维修。

计算机与计算机控制的精密仪器,对供电电压和频率有一定要求。为防止电压瞬变、瞬时停电、电压不足等影响仪器的工作,可根据需要选用不间断电源(UPS)。

三、实验操作室设计及布局

在疫病诊断监测工作中,常使用一些电器设备及各种试剂,如操作不慎,也具有一定的危险性。针对这些使用特点,在实验操作室设计上应注意以下要求。

(一) 建筑要求

实验室的建筑应耐火或用不易燃烧的材料建成,隔断和顶棚也要考虑到防火性能。可采用水磨石地面,窗户要防尘,室内采光要好。门应向外开,实验室应设两个出口,以便于发生意外时人员的撤离。

(二) 供水和排水

供水要保证必需的水压,水质和水量应满足仪器设备正常运行的需要。室内总阀门应设在易操作的显著位置。下水道应采用耐酸碱腐蚀的材料,地面应有地漏。排出的污水应有污水处理设施,以防止病原微生物的扩散。

(三) 通风设施

诊断监测中常产生有毒或易燃的气体。因此,化验室应有良好的通风条件,通风设施一般有以下几种:

(1) 全室通风:采用排风扇或通风竖井,换气次数一般为每小时5次。

(2) 局部排气罩:一般安装在大型仪器发生有害气体部位的上方,设置局部排气罩,以减少室内空气的污染。

(3) 通风柜:又称毒气柜,是实验室常用的一种局部排风设备。内有加热源、照明等装置。可采用防火防爆的金属材料制作通风柜,内涂防腐涂料,通风管道要能耐酸碱气体腐蚀。风机可以安装在顶层机房内,并且有减少震动和噪声的装置,排气管应高于屋顶2 m以上。一台排风机连接一个通风柜较好,不同房间共用一个风机和通风管道易产生交叉污染。通风柜在室内应放在空气流动较小的地方,不要靠近门窗。

(四) 实验台

实验台主要由台面、台下支架和器皿柜组成。为方便操作,台上可设置试剂架,台的两端可安装水槽。实验台面一般宽75~150 cm,长根据房间大小可为160~320 cm,高可为80~90 cm。台面常用水磨石预制板、木材等制成。理想的台面应平整,不易碎裂,耐酸碱及溶剂腐蚀,耐热,不易碰碎玻璃仪器等。加热设备可置于砖砌底座的水泥台面上,高度为50~70 cm。

(五) 供电

化验室的电源可分为照明用电和设备用电。照明最好采用日光灯。设备用电中,24 h运行的电器如冰箱单独供电,其余设备均由总开关控制,烘箱、电炉等电热设备应有专用插座、开关和熔断器。

第二节 无菌室

无菌室又名净化实验室,是进行无菌操作的实验室,常用于细胞培养和病毒分离等工

作。其作用主要是避免培养物的污染。

无菌室应设置在实验室的最里面,防止空气流动引起污染。无菌室包括操作室、缓冲间和更衣室。操作室不宜过大或过小。缓冲间主要目的是保护操作室的无菌环境,避免因空气对流使外界空气直接进入操作室。同时,还可以放置恒温培养箱、显微镜和离心机等实验仪器,使实验在相对无菌条件下完成,而不必携出室外。更衣室主要是隔离衣的着装处。无菌操作室内密闭不透风,温、湿度和二氧化碳浓度较高,易滋生细菌,损害工作人员的健康,应安装过滤空气的恒温恒湿调节器,操作室内空气粉尘指数应达百级净化。

设计无菌操作室时应注意以下几点:

- (1) 为防止室内温度增高,要选择阳光不能直接照射到的位置,最好设在阴面;
- (2) 天花板高度不要超过 2 m,以保证紫外灯的有效消毒效果;
- (3) 室内要防止空气流动,宜安装横拉门和双层密闭毛玻璃窗;
- (4) 天花板、地板和四周墙壁要光滑无死角,宜镶瓷砖或涂油漆,以便于清洁和消毒;
- (5) 恒温恒湿调节器应采用空气室内回流和补充少量过滤新鲜空气系统。

第三节 实验室的管理规程

为加强实验室的科学化、系统化、标准化管理,应制定兽医诊断实验室的有关管理规定。

一、进入实验室的规定

- (1) 实验室设更衣室,工作人员进入实验室必须更换工作服,必要时需戴工作帽、防护面罩、防护手套,穿防护鞋。
- (2) 工作人员穿的工作服等防护性用品至少每周洗涤、灭菌一次。
- (3) 非工作人员进入实验室需经有关领导批准,并遵守实验室的有关规定。
- (4) 实验室内禁止大声喧哗、吸烟和饮食等。
- (5) 实验室工作人员需经实验技能考核,合格后方可上岗。

二、安全操作规定

为了保证实验室工作人员的健康,增强安全保护意识,特制定本规定。

- (1) 成立实验室安全工作委员会,负责实验室安全工作的布置、安排和检查。对实验室工作人员例行体检及预防免疫注射。对实验室人员进行各种危险物品的性质、使用要求和各种仪器设备的安全使用培训及中毒、受伤急救措施的培训,做好个人防护。

- (2) 实验室应保持实验台面、地面、各种仪器设备的干净、整洁。禁止在实验室内大声喧哗、吸烟、饮食。实验操作时须穿戴工作衣、帽、手套。非工作人员未经许可不得入内。

- (3) 无菌室、无菌罩、超净工作台应保持清洁,定期做熏蒸消毒处理。每次使用前用紫外灯照射 30 min,使用后用 70% 的酒精消毒台面,对实验废弃的物品进行消毒、高压灭

菌处理。

(4) 常规试验用过的培养基、试剂、试管、平皿、吸管等试验用品须经有效的消毒处理后方可丢弃或清洗。

(5) 由专人负责菌种、毒种的保存、繁殖、传代,按照“菌种、毒种的管理规定”做好各项工作。

(6) 每日上班后检查温箱、冰箱的工作情况,并建档记录温度升降情况。下班前检查水、电、气、门、窗,确保安全。发现隐患,及时处理。

(7) 在存放、操作菌种、毒种的设备上和存在对工作人员健康危害的地方加贴危害标记和安全提示语。

(8) 易燃、易爆、剧毒物品应严格按照“诊断试剂管理规定”的各项要求去做。

(9) 实验室应备有适用于各种火灾的小型灭火器,所有实验室人员都应学会灭火器的使用方法,发现火灾及时报警。

三、仪器管理规定

为加强实验室仪器设备的管理,规范贵重仪器的使用操作和合理利用,特制定本规定。

(1) 建立《仪器设备保养登记卡》,其内容包括设备名称、制造商、型号、产品编号、售价、购买日期、保修截止日期、提供零部件和维修保养单位、电话、传真、要求维护项目、使用地点、仪器管理人员等。每物一卡,长期保存。

(2) 仪器设备的使用和保管要实行“三定制度”,即定位(固定放置位置)、定人(固定管理人员)、定操作规范。

(3) 使用、保管有关仪器设备的人员,须熟练掌握有关仪器的操作程序和保养要求,按照规定的操作程序进行操作。

(4) 设立贵重仪器的使用登记簿。每次用毕,使用人员须登记仪器使用情况。

(5) 各种仪器设备须定期维护、校正。

(6) 外单位工作人员因工作需要使用本单位的贵重仪器时,凭单位介绍信和本人工作证接洽,经领导同意后方可使用,并在贵重仪器使用登记簿上登记,酌情收取使用费。

(7) 仪器设备故障时应由专业人员维修,并填写《设备维修单》。

(8) 仪器设备需作报废处理的,提出书面申请,经有关部门核实后,按规定办理报废手续。

四、毒种、菌种管理规定

为了满足动物疫病检测、诊断、鉴定和科研需要,保证毒种、菌种合理安全使用,防止其扩散成为污染源,特制定本规定。

(一) 毒种、菌种的管理

(1) 保存毒种、菌种的实验室要有严格的安全管理措施、专门的管理人员和安全的存放条件。

(2) 新引进毒种要求未被其他微生物污染并进行毒价测定,新引进的菌种要进行纯

化和生化鉴定。

(3) 毒种、菌种的调出和使用需经主管领导批准。

(二) 毒种、菌种的保存

(1) 建立《毒种、菌种保存登记卡》，其内容包括名称、来源、取出存入数量、使用繁殖日期、毒价、繁殖细胞或动物、保管实验室、保管人、剩余量、最小库存量。每个毒种(菌种)一卡，长期保存。

(2) 根据病毒的特性选择适宜的保存方式和温度，保藏要用小剂量密封瓶并作好标记。

(3) 根据毒种情况，定期进行毒价测试，对毒价下降的应及时复壮。

(4) 室温下，在 TSA 斜面上保存的菌种，每两周传代一次。

(5) 软琼脂 4℃ 保存的菌种，每半年传代一次。

(6) 冻干保存的菌种，每年做一次活性检查，必要时重新繁殖冻干。

(7) 每次使用、繁殖病毒或细菌都要在《毒种、菌种保存登记卡》上记录。剩余最小库存量时必须进行繁殖，发现毒种、菌种变异或退化时应及时报告，并查明原因。

五、诊断试剂管理规定

为加强实验室诊断用试剂的管理，规范其使用和保存管理方法，特制定本管理规定。

(1) 本规定所指诊断试剂为实验室在诊断检测过程中使用的所有生物和化学试剂。

(2) 实验室购进的诊断试剂须为有关部门注册、批准生产的产品。

(3) 所有购进、取出的试剂须登记注册，填写《诊断试剂库存使用卡》，其内容包括名称(化学名、商品名、英文名及分子式)、规格、数(重)量、质量等级、有效期、购买人、存放地点、供货单位名称、电话等。

(4) 所有试剂必须妥善保存。化学试剂应保存于干燥、避光、阴凉处并远离火源。生物制剂按其特定要求存放。易燃易爆药品、氧化剂、腐蚀性药品须分别存放，并配备必要的防护用品及灭火器。

①危险物品的管理：易燃、易爆、腐蚀性、放射性药(物)品及剧毒药品均属危险物品，必须由专人专库专账保管，经批准方可出入库。

②危险物品必须贴有完整清晰的警示标志，严防误用。

③危险物品的存放保管要按其理化性质采取相应的安全措施，严密封固。

④危险物品的领用，须填领用单，经诊断室主任批准后限额如数领取；领取后未用或用后剩余的危险化学品应及时注明数量退回库房，使用后的有毒残液应进行无害化处理。

(5) 试剂须由专人保管。保管人员要定期核查，对过期、潮解、变质试剂及时清理并进行无害化处理的同时，呈报试剂购置计划。

(6) 对贴有毒有害标记的各种化学和生物试剂，在搬运和使用过程中要配备防护用品，做好个人防护。

六、实验室卫生制度

(1) 讲究个人卫生，在实验室内禁止会客、吸烟、饮食、随地吐痰等。

(2) 禁止非工作人员随便进入实验室,禁止将与诊断检测无关的物品带入,在实验室内禁止做与检测无关的事情。

(3) 进入实验室的工作人员一律穿着工作制服,进入无菌工作间的人员须重新更换工作衣、帽、鞋等。

(4) 每日早上清扫,周末大扫除,保持实验室清洁卫生。

(5) 实验室仪器设备、玻璃器材、药品等应摆设整齐,布置合理,保持洁净;经常清理培养箱、冰箱等,并及时消毒处理使用过的培养基、试管及其他物品,防止腐败发臭。

(6) 每次试验完成后及时消毒处理使用过的实验用品,将其清洗、包装、消毒后备用。

第四节 实验室生物安全知识

一、生物安全的原则

“防护”一词是描述在有感染病原体存在的实验室环境中,处理感染病原体的安全方法。防护的目的是减少或消除实验室工作人员和其他人员受到感染的可能性,以及外环境受到潜在的有害病原体的危害。

一级防护是指对暴露于传染性微生物的人员和实验室内环境的防护,由良好的微生物学操作技术和适当的安全设备提供。使用疫苗可以提高个人防护水平。二级防护是指实验室外环境对传染性微生物的防护,由安全设备的设计和操作规程的结合来提供。所以,防护的三个要素包括实验室操作技术、安全设备和实验室设计,在从事某一特定病原体工作时,其危险性高低将决定这些要素的配备要求。

二、实验室操作技术

防护的最重要因素是严格遵守标准的微生物操作规程。从事感染性微生物或可能有感染性材料的工作人员必须意识到潜在的危害,并接受培训和熟练掌握安全处理这些材料的操作技术。实验室主任或负责人有责任安排工作人员的培训。

每个实验室应该制定一系列规章制度或一套生物安全操作手册,明确可能遇到的危害,并说明减少或消除这些危害的操作程序。应使工作人员了解危害性,要求他们阅读和遵守有关操作程序。要由在实验室技术、安全操作程序和处理感染性病原体危害方面受过训练的专家全面指导实验室工作。

当标准的实验室操作不能充分控制与特殊病原体或实验室安全程度相关的危害时,额外的措施是必需的。

三、安全设备(一级屏障)

安全设备包括系列生物安全柜、各种密闭容器和其他为了消除或减少暴露于有害生物材料所设计的工程控制设施。生物安全柜是主要的设备,用于许多微生物学操作过程中产生的感染性溅出物或气溶胶的防护。在具有良好的微生物操作技术时,前开门式Ⅰ级和Ⅱ级生物安全柜是为实验室工作人员和环境提供良好保护的一级屏障。Ⅱ级生物安

全柜还可以防止放置在生物安全柜中的材料(细胞培养、微生物贮存菌种等)的外污染。Ⅲ级气密型生物安全柜可以对工作人员和环境提供最高水平的保护。其他一些一级屏障还有安全离心机罩以及为防止在离心过程中气溶胶被释放出而设计的密闭容器。为了减少这种危险,在处理可以通过气溶胶途径传播的感染性微生物时必须使用生物安全柜或离心机罩。安全设备还包括个人防护用品,例如手套、外套、长服、鞋套、长筒靴、口罩、面罩、安全眼镜或防风镜等。使用生物安全柜和其他设备进行病原体、动物或其他材料的研究时,通常与个人防护设备联合使用。某些情况下不能在生物安全柜里进行操作时,个人防护设备可以在工作人员和感染性材料之间形成一级屏障。例如某些动物实验、动物尸体解剖、致病微生物生产过程以及有关设施的维护、服务或实验室设备供应等相关的活动。

四、实验室建筑设计(二级屏障)

为了对在同一建筑物中实验室内外工作的工作人员提供保护屏障,以及防止社会上的人员或动物接触从实验室偶然释放出来的感染性微生物,建筑物的设计是非常重要的。实验室管理部门负责提供与实验室功能相适应的设施和为所从事的致病病原体应采用何等级的生物水平提出建议。提出的二级屏障取决于特殊致病微生物传播的危害性。例如,在一级和二级生物安全水平设施里的大多数实验室工作的暴露危险是直接接触致病病原体,或由于疏忽接触污染的工作环境。在这些实验室中,二级屏障包括实验室工作区和公共通道的分开,使用消毒设备(如高压灭菌器)和洗手装置。随着气溶胶传播危险的增加,为防止感染性微生物溢出进入环境,较高水平的一级防护和多级的二级屏障是必要的。它们的设计性能包括:保证定向气流的特殊通风系统,从排出的气体中消除或除去致病因子的空气处理系统,可控制的通过区,单独建筑物或利用把实验室分开的缓冲间。

第二章 仪器及器材

第一节 仪 器

一、显微镜

(一) 普通光学显微镜

1. 显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可分为两大部分:一为机械装置,一为光学系统。这两部分很好的配合,才能发挥显微镜的作用。

1) 显微镜的机械装置

显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋、微动螺旋等部件。

2) 显微镜的光学系统

显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜、接目镜等组成,光学系统使物体放大,形成物体放大像。

2. 显微镜的使用方法

显微镜结构精密,使用时必须细心,要按下述操作步骤进行。

1) 观察前的准备

(1) 显微镜从显微镜柜或镜箱内拿出时,要用右手紧握镜臂,左手托住镜座,平稳地将显微镜搬运到实验桌上。将显微镜放在自己身体的左前方,离桌子边缘约 10 cm,右侧可放记录本或绘图纸。

(2) 调节光照。将 10×物镜转入光孔,将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置,用左眼观察目镜中视野的亮度,转动反光镜,使视野的光照达到最明亮、最均匀为止。光线较强时,用平面反光镜;光线较弱时,用凹面反光镜。自带光源的显微镜,可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

(3) 调节光轴中心。显微镜在观察时,其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。带视场光阑的显微镜,先将光阑缩小,用 10×物镜观察,在视场内可见到视场光束圆球多边形的轮廓像,如此像不在视场中央,可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央,然后缓慢地将视场光阑打开,能看到光束向视场周缘均匀展开,直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接,说明光线已经合轴。

2) 低倍镜观察

镜检任何标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大,易于发

现目标和确定检查的位置。

将标本片放置在载物台上,用标本夹夹住,移动推动器,使被观察的标本处在物镜正下方,转动粗调节旋钮,使物镜调至接近标本处,用目镜观察并同时用粗调节旋钮慢慢升起镜筒(或下降载物台),直至物像出现,再用细调节旋钮使物像清晰为止。用推动器移动标本片,找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

3) 高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜,低倍、高倍镜头是同焦的,在正常情况下,高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜,在转换物镜时要从侧面观察,避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察,调节光照,使亮度适中,缓慢调节粗调节旋钮,使载物台上升(或镜筒下降),直至物像出现,再用细调节旋钮调至物像清晰为止,找到需观察的部位,并移至视野中央进行观察。

4) 油镜观察

检查微生物常用油镜。油镜的标志是:油镜头下缘有一圈黑线或两圈红线和放大 $100\times$ 的标志;有“oil”字样长度大于低倍镜和高倍镜。油浸物镜的工作距离(指物镜前透镜的表面到被检物体之间的距离)很短,一般在 0.2 mm 以内,避免由于“调焦”不慎而压碎标本片并使物镜受损。

使用油镜按下列步骤操作:

(1)先用粗调节旋钮将镜筒提升(或将载物台下降)约 2 cm ,并将高倍镜转出。

(2)在玻片标本的镜检部位滴上一滴香柏油。

(3)从侧面注视,用粗调节旋钮将载物台缓缓地上升(或镜筒下降),使油浸物镜浸入香柏油中,使镜头几乎与标本接触。

(4)从接目镜内观察,放大视场光阑及聚光镜上的虹彩光圈(带视场光阑油镜开大视场光阑),上调聚光器,使光线充分照明。用粗调节旋钮将载物台徐徐下降(或镜筒上升),当出现物像一闪后改用细调节旋钮调至最清晰为止。如油镜已离开油面而仍未见到物像,必须再从侧面观察,重复上述操作。

(5)观察完毕,下降载物台,将油镜头转出,先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用擦镜纸蘸少许二甲苯,擦去镜头上残留油迹,最后再用擦镜纸擦拭 $2\sim 3$ 下即可(注意向一个方向擦拭)。

(6)将各部分还原,转动物镜转换器,使物镜头不与载物台通光孔相对,而是成八字形位置,再将镜筒下降至最低,降下聚光器,反光镜与聚光器垂直,用一个干净手帕将接目镜罩好,以免目镜头沾污灰尘。最后用柔软纱布清洁载物台等机械部分,然后将显微镜放回柜内或镜箱中。

3. 维护及保养

(1)整体保养:生物显微镜要放置在干燥、阴凉、无尘、无腐蚀的地方。使用后,要立即擦拭干净,用防尘透气罩罩好或放在箱子内。

(2)机械系统的维护保养:使用后,用干净细布擦净,定期在滑动部位涂些中性润滑脂。如有严重污染,可先用汽油洗净后再擦干。但切忌用酒精或乙醚清洗,因为这些试剂会腐蚀机械和油漆,造成损坏。

(3) 光学系统的维护保养:使用后,用干净柔软的绸布轻轻擦拭目镜和物镜的镜片。有擦不掉的污迹时,可用长纤维脱脂棉或干净的细棉布蘸少许二甲苯或镜头清洗液(3份无水乙醇:2份乙醚)擦拭。然后用干净细软的绸布擦干或用吹风球吹干即可。要注意的是清洗液千万不能渗入到物镜镜片内部,否则会损坏物镜镜片。聚光镜和反光镜用后只要擦干净就可以了。

4. 用途

普通光学显微镜用于细菌形态和构造的观察,使用油镜放大1 000倍,一般细菌均能清楚看到。

(二) 倒置显微镜

1. 构造

组成和普通显微镜一样,只不过物镜与照明系统颠倒,前者在载物台之下,后者在载物台之上,用于观察培养的活细胞。

2. 使用方法

以 OLYMPUS 倒置显微镜 IMT-2 为例。

(1) 观察准备:打开电源开关,调节电压至适中。

(2) 聚光器对中:把聚光器转盘放到“0”位置。在10×物镜下聚焦。观察视场光束调节聚光镜高度直至光阑的像能够清楚地看到。转动对中螺杆将视场光束像调到视场中心,重新打开视场光阑,实际用时轻开视场光束使视野变圆。

(3) 灯泡对中:打开全部光路对中卤素灯泡。将放大旋钮转至“CT”位置。转聚焦旋钮,在10×物镜下聚焦。打开毛玻璃,使灯丝的影子可以看到。松开灯丝卡紧螺丝,使灯室沿轴向运动,直到灯丝聚焦清楚。用灯室聚中旋钮将灯丝的影子移到中心,重新关上毛玻璃滤片。

(4) 光环对中:IMT-2 显微镜采用每一个像环的单独对中系统,光环和物镜的放大率相匹配。对中过程由低倍到高倍引进,当培养瓶底不平时,需要重新引进光环对中。找到所需要的物镜,聚焦使标本清楚。转变放大率变化盘到“CT”位置。用聚焦环聚焦在像环上。压光环对中旋钮转动直到两环重叠,然后缓慢放回对中旋钮,转放大变化盘到“1×”位置,观察和选择标本相差效果。

(5) 滤光片选择:滤光片的最佳使用能够有效地提高观察和显微镜片的质量。

3. 显微照相系统操作

(1) 照相控制盒上选定底片尺寸。

(2) 安装胶卷。

(3) 选定胶卷的感光度。一般为 ASA100。

(4) 转动取景目镜筒上圆环,使取景框中的双十字线达到最清晰的程度。

(5) 光片和灯泡电压的调节。将所需要的标本组织调在视场的中心位置。按下快门按钮,曝光完毕以后,细听一下底片转过去的声音。

4. 用途

主要用于观察培养的活细胞。